

日本国特許
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP 00/00567

9/890579

02.02.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

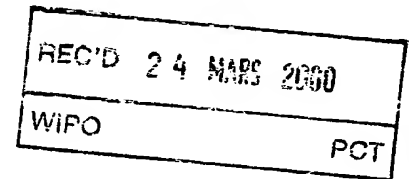
1999年 2月 2日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第024625号

出願人
Applicant(s):

株式会社ヘリックス研究所



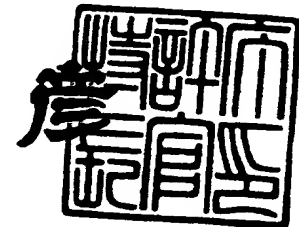
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3013983

【書類名】 特許願

【整理番号】 H1-007

【提出日】 平成11年 2月 2日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市八幡台 5 - 2 9 - 6

 【氏名】 若尾 りか

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県木更津市八幡台 5 - 2 9 - 6

 【氏名】 若尾 宏

【特許出願人】

 【識別番号】 597059742

 【氏名又は名称】 株式会社ヘリックス研究所

 【代表者】 永山 治

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716404

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 脂肪細胞への分化を誘導する方法、並びに脂肪細胞への分化を制御する化合物およびそのスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる方法であって、プロラクチンまたはその同効物の共存下で多能性間葉系幹細胞を培養する工程を含む方法。

【請求項 2】 さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 多能性間葉系幹細胞がNIH-3T3細胞である、請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】 脂肪細胞の分化阻害剤または促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料、およびプロラクチンまたはその同効物の共存下、多能性間葉系幹細胞を培養する工程、

(b) 該細胞の脂肪細胞への分化を検出する工程、および

(c) 被検試料非共存下（対照）における場合と比べ、該変化を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 6】 さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】 脂肪細胞への分化を、細胞質中の脂肪の蓄積、脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子の発現、または脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現を指標として検出する、請求項 5 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 多能性間葉系幹細胞がNIH-3T3細胞である、請求項 5～8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】 脂肪細胞への分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

- (a) プロラクチンと被検試料とを接触させる工程、および
- (b) プロラクチンに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 11】 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

- (a) プロラクチン受容体と被検試料とを接触させる工程、および
- (b) プロラクチン受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 12】 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

- (a) 被検試料の存在下でプロラクチンとプロラクチン受容体とを接触させる工程、および
- (b) プロラクチンとプロラクチン受容体との結合を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 13】 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

- (a) 内在性プロラクチン受容体を発現する細胞であって、かつプロラクチンに応答して活性化するプロモーターおよびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞を提供する工程、
- (b) 該細胞に対し、被検試料、または被検試料およびプロラクチンを接触させる工程、および
- (c) 該細胞におけるレポーター活性を検出する工程、を含む方法。

【請求項 14】 プロラクチン阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤。

【請求項 15】 プロラクチン受容体阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤。

【請求項 16】 プロラクチン活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤。

【請求項 17】 プロラクチン受容体活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞

分化促進剤。

【請求項 1 8】 請求項 5 から 1 3 のいずれかに記載の方法により単離しうる、脂肪細胞分化阻害剤または脂肪細胞分化促進剤。

【請求項 1 9】 プロラクチンを有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤。

【請求項 2 0】 プロラクチンを有効成分とする、PPAR γ の発現誘導剤。

【請求項 2 1】 プロラクチンを有効成分とする、C/EBP β の発現誘導剤。

【請求項 2 2】 プロラクチンの細胞内シグナル伝達を阻害もしくは亢進する化合物であって、脂肪細胞分化を阻害または促進する化合物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導する方法、並びに脂肪細胞の分化を促進または阻害する化合物およびそれらのスクリーニング方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

脂肪細胞は生体におけるエネルギー代謝の調節において重要な役割を果たしており、肥満や糖尿病などの疾患には脂肪細胞の異常が深く関わっていることが知られている。脂肪細胞は、多能性間葉系幹細胞 (multipotential mesenchymal stem cells) と呼ばれる一群の細胞から分化する。

【0 0 0 3】

多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への変換は、細胞増殖の停止、形態変化、および分化による遺伝子発現の変化を伴っている (O.A. MacDougald and M.D. Lane (1995) Annu. Rev. Biochem. 64: 345-373; L. Fajas et al. (1998) Curr. Opin. Cell Biol. 10: 165-173)。3T3-L1や3T3-F422A細胞などの脂肪前駆細胞株を用いることによって、脂肪細胞への分化に重要ないくつかの遺伝子がこれまでに解明されてきた。これらはC/EBPファミリーやADD-1などの転写因子、核内ホルモンレセプターであるPPAR γ などで、脂肪細胞への分化過程のある一定時期に発現

され、脂肪細胞特異的遺伝子の発現を促進したり抑制したりすることで分化の制御を行っている。

【0004】

C/EBPファミリータンパク質は構造が共通しており、C末端領域にダイマー形成のためのロイシンジッパー (leucine zipper) とDNA結合のための塩基性残基を有する。C/EBPファミリーの中で、C/EBP α 、 β 、 δ 、およびCHOP (Gadd153) は脂肪細胞成熟(adipogenesis)に関与していることが知られている (F.T. Lin and M.D. Lane (1992) *Genes Dev.* 6: 533-544; S.O. Freytag et al., (1994) *Genes Dev.* 8: 1654-1663; F.T. Lin and M.D. Lane (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8757-8761; W.C. Yeh et al. (1995) *Genes Dev.* 9: 168-181; N. Batchvarova et al. (1995) *EMBO J.* 14: 4654-4661)。C/EBP β およびC/EBP δ mRNAは3T3-L1細胞分化の初期において発現が誘導されるが、C/EBP α は分化の比較的后期に発現が誘導される (Z. Cao et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 1538-1552)。PPAR γ およびADD-1は、細胞の分化が進むにつれて発現が増加する (Tontonoz et al., 1994, *Cell*, 79 1147-1156; J.B. Kim and B.M. Spiegelman (1996) *Genes Dev.* 10: 1096-1107)。これらC/EBPファミリーのうち1つを異所的に発現させると、脂肪前駆細胞や多能性間葉系幹細胞は脂肪細胞へ変換されることから、C/EBPファミリーは脂肪細胞への分化の重要な制御因子であると考えられる。例えばC/EBP β を多能性間葉系幹細胞において異所的に発現させると脂肪細胞への変換が引き起こされる。C/EBP δ の異所的な発現でも、活性は弱い、同様の効果がある (Yeh et al. (1995) *Genes Dev.* 9: 168-181)。また、C/EBP β のドミナントネガティブ (優勢抑制) 変異体を過剰発現させると、3T3-L1細胞の分化が阻害される (Yeh et al. (1995) *Genes Dev.* 9: 168-181)。C/EBP α も脂肪細胞分化に重要な役割を果たしており、C/EBP α のアンチセンスRNAの細胞内導入により3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化が遮断される (F.T. Lin and M.D. Lane (1992) *Genes Dev.* 6: 533-544)。また反対にC/EBP α を多能性間葉系幹細胞に強発現させることにより、脂肪細胞分化誘導ホルモンの非存在下でも脂肪細胞へ分化させることができる (S.O. Freytag et al., (1994) *Genes Dev.* 8: 1654-1663; F.T. Lin and M.D. Lane (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8757-8761

）。CHOP (Gadd153) はC/EBP α やC/EBP β と強くダイマーを形成し、これらのC/EBPタンパク質がDNAへ結合するのを阻害する (D. Ron and J.F. Habener (1992) Genes Dev. 6: 439-453)。その結果、3T3-L1細胞の脂肪細胞への分化は阻害される (N. Batchvarova et al. (1995) EMBO J. 14: 4654-4661)。

【0005】

C/EBP α を欠損させたマウスは、褐色脂肪細胞 (brown adipose tissue; BAT) および白色脂肪細胞 (white adipose tissue; WAT) が顕著に減少している (N.D. Wang et al. (1995) Science 269: 1108-1112)。またC/EBP β または δ を欠損させたマウスは、胎児繊維芽細胞初代培養の脂肪細胞への分化を弱く阻害し、精巢上体のWATの体積をわずかに減少させる (T. Tanaka et al. (1997) EMBO J. 16: 7432-7443)。これに対してC/EBP β および δ の二重ノックアウトマウスでは脂肪細胞への分化が顕著に阻害され、脂肪細胞の減少によりWAT重量の深刻な減少が引き起こされる (T. Tanaka et al. (1997) EMBO J. 16: 7432-7443)。

【0006】

PPAR γ はリガンドにより活性化される核内ホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写因子である (S.A. Kliewer et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 7355-7359; D.J. Mangelsdorf et al. (1995) Cell 83: 835-839)。この遺伝子の発現は脂肪組織で極めて高いが、それ以外でも発現が認められる。多能性間葉系幹細胞においてPPAR γ を強制的に発現させると、PPAR γ のリガンド/アゴニストであるチアゾリジンジオン、またはプロスタグランジン存在下で脂肪細胞への分化が引き起こされる (Tontonoz et al., 1994 Cell, 79 1147-1156; B.M. Forman et al. (1995) Cell 83: 803-812; S.A. Kliewer et al. (1995) Cell 83: 813-819)。脂肪細胞においては、PPAR γ は脂肪細胞の分化に関連する遺伝子である422/aP2、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK)、およびリポプロテインリパーゼ (LPL) 等を活性化する。実際、これらの遺伝子のプロモーターには、PPAR γ 結合部位が含まれている (Tontonoz et al., 1994 Genes and Dev. 8, 1224-1234; K. Schoonjans et al. (1996) EMBO J. 15: 5336-5348)。これらの実験から、PPAR γ は脂肪細胞成熟にとって鍵となる遺伝子であることが判明している。また最近、PPAR γ が炎症反応の制御やマクロファ

ージの分化にも関与していることが明らかにされた (M. Ricote et al. (1998) Nature 391: 79-82; C. Jiang et al. (1998) Nature 391: 82-86; L. Nagy et al. (1998) Cell 93: 229-240; P. Tontonoz et al. (1998) Cell 93: 241-252)。

【0007】

ADD-1は異なるファミリーに属する転写因子であり、塩基性に富んだアミノ酸残基-ヘリックス-ループ-ヘリックス-ロイシンジッパーモチーフを有する (P. Tontonoz et al. (1993) Mol. Cell. Biol. 13: 4753-4759)。脂肪前駆細胞3T3-L1の脂肪細胞への分化におけるADD-1の発現パターンはPPAR γ とよく似ている。PPAR γ の場合と同様、多能性間葉系幹細胞においてADD-1は異所的に高発現させると、PPAR γ 活性化因子存在下で多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる (J.B. Kim and B.M. Spiegelman (1996) Genes Dev. 10: 1096-1107)。また興味深いことに、ADD-1のヒトホモログであるステロール制御配列結合タンパク質 (SREBP1) は、コレステロール代謝に関連する遺伝子の制御に関与している (C. Yokoyama et al. (1993) Cell 75: 187-197)。

【0008】

前述のように、これらの転写因子は脂肪細胞分化に重要な役割を果たしていることが知られているが、これらの遺伝子の発現や機能は脂肪組織および／または脂肪細胞の分化に限られたものではない。また、脂肪前駆細胞の分化の初期において、細胞がどのように脂肪細胞へと分化することが決定 (コミット) されるのかについてもほとんど知られていない。

【0009】

脂肪前駆細胞3T3-L1を脂肪細胞へ分化させるためには、ウシ胎児血清 (FBS)、メチルイソブチルキサンチン (methylisobutylxanthine; MIX)、デキサメタゾン (dexamethasone; DEX)、およびインスリンなどの脂肪細胞分化誘導ホルモン (adipogenic hormones) が必要である。このうちMIXはC/EBP β および δ を誘導し、DEXはC/EBP δ を誘導することが知られている (Z. Cao et al. (1991) Genes Dev. 5: 1538-1552) が、脂肪細胞への分化 (adipogenesis) の初期におけるPPAR γ の発現制御に関しては、ほとんど知られていない。

【0010】

PPAR γ mRNAの発現がどのように制御されるのかについては、C/EBP β の上昇が PPAR γ の発現に重要である可能性が考えられる (Z. Wu et al. (1996) Mol. Cell Biol. 16: 4128-4136; Z. Wu et al. (1995) Genes Dev. 9: 2350-2363) もの、*in vivo* の実験からは、PPAR γ 発現はC/EBP β にはほとんど依存していないことが示唆されている (T. Tanaka et al. (1997) EMBO J. 16: 7432-7443)。PPAR γ の発現誘導を含めた脂肪細胞分化決定の分子制御機構を解明することが求められていた。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、脂肪細胞の分化制御機構を解明し、これにより脂肪細胞の分化を誘導するための新たな方法、並びに脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物およびそれらのスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために、まず、脂肪細胞への分化の重要な制御因子であることが知られているC/EBPファミリー遺伝子および脂肪細胞への分化の鍵となる遺伝子であると考えられているPPAR γ 遺伝子の発現を誘導する因子の探索を行い、その結果、ウシ胎児血清 (FBS) の成分の一つであるプロラクチンが、少なくとも多能性間葉系幹細胞において、C/EBP β 遺伝子およびPPAR γ 遺伝子の転写を誘導することを見出した。

【0013】

また、本発明者らは、実際に、プロラクチンが強い許容培養条件下 (即ち、PPAR γ リガンド／アゴニストの存在下) で多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる能力を有することを見出した。

【0014】

さらに、本発明者らは、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化におけるプロラクチン受容体の関与を検討した結果、プロラクチン受容体が、プロラクチンおよびPPAR γ 活性化因子の存在下において多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化

を高い効率で誘導することを見出した。

【0015】

即ち、本発明者らは、プロラクチンおよびPPAR γ によるシグナルが協調して、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導していることを初めて実証することに成功した。

【0016】

さらに、本発明者らは、プロラクチンを用いた上記脂肪細胞の分化系を利用して、また、脂肪細胞分化のシグナルの伝達に関連する上記因子を標的として、脂肪細胞の分化を制御する化合物のスクリーニングを行い得ることを見出した。

【0017】

従って、本発明は、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導する方法、並びに脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物およびそれらのスクリーニング方法に関し、より具体的には、

(1) 多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる方法であって、プロラクチンまたはその同効物の共存下で多能性間葉系幹細胞を培養する工程を含む方法

(2) さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、(1)に記載の方法、

(3) 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、(1)または(2)に記載の方法、

(4) 多能性間葉系幹細胞がNIH-3T3細胞である、(1)～(3)のいずれかに記載の方法、

(5) 脂肪細胞の分化阻害剤または促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料、およびプロラクチンまたはその同効物の共存下、多能性間葉系幹細胞を培養する工程、

(b) 該細胞の脂肪細胞への分化を検出する工程、および

(c) 被検試料非共存下(対照)における場合と比べ、該変化を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(6) さらに、PPAR γ 活性化剤が共存している、(5)に記載の方法、

(7) 多能性間葉系幹細胞が外来性のプロラクチン受容体を発現している、
(5) または (6) に記載の方法、

(8) 脂肪細胞への分化を、細胞質中の脂肪の蓄積、脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子の発現、または脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現を指標として検出する、(5) から (7) のいずれかに記載の方法、

(9) 多能性間葉系幹細胞がNIH-3T3細胞である、(5) ~ (8) のいずれかに記載の方法、

(10) 脂肪細胞への分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) プロラクチンと被検試料とを接触させる工程、および

(b) プロラクチンに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(11) 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) プロラクチン受容体と被検試料とを接触させる工程、および

(b) プロラクチン受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(12) 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 被検試料の存在下でプロラクチンとプロラクチン受容体とを接触させる工程、および

(b) プロラクチンとプロラクチン受容体との結合を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) 脂肪細胞の分化阻害剤または分化促進剤をスクリーニングする方法であって、

(a) 内在性プロラクチン受容体を発現する細胞であって、かつプロラクチンに応答して活性化するプロモーターおよびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を含むベクターが導入された細胞を提供する工程、

(b) 該細胞に対し、被検試料、または被検試料およびプロラクチンを接触させる工程、および

(c) 該細胞におけるレポーター活性を検出する工程、を含む方法、

- (14) プロラクチン阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤、
- (15) プロラクチン受容体阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤、
- (16) プロラクチン活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤、
- (17) プロラクチン受容体活性化剤を有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤、
- (18) (5) から (13) のいずれかに記載の方法により単離しうる、脂肪細胞分化阻害剤または脂肪細胞分化促進剤、
- (19) プロラクチンを有効成分とする、脂肪細胞分化促進剤、
- (20) プロラクチンを有効成分とする、PPAR γ の発現誘導剤、
- (21) プロラクチンを有効成分とする、C/EBP β の発現誘導剤、
- (22) プロラクチンの細胞内シグナル伝達を阻害もしくは亢進する化合物であって、脂肪細胞分化を阻害または促進する化合物、に関する。

【0018】

なお、本発明において「多能性間葉系幹細胞」とは、胚において単独で存在（単細胞）して機能し、軟骨、筋、脂肪細胞に分化する能力を有する細胞を指す。また、本発明において「脂肪細胞」とは、脂肪組織を構成する主な細胞で、内部に脂肪を含んでおり、体内エネルギーの貯蔵（lipogenesis）と動員（lipolysis）を行う細胞を指す。また、「脂肪細胞への分化」には、完全な分化のみならず、脂肪細胞への分化の誘導に伴う諸変化も含まれる。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明において、プロラクチンが多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導する能力を有することが見出された。従って、本発明は、第一に、プロラクチンの共存下で多能性間葉系幹細胞を培養する工程を含む多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる方法に関する。本発明の方法において用いられるプロラクチンとしては、天然由来のプロラクチンの他、遺伝子組換え技術により調製した組み換えプロラクチンを用いることも可能であり、また、市販のものを用いることも可能である（例えば、Sigma 社から販売されている）。また、多能性間葉系幹

細胞を脂肪細胞へ分化させる能力を有する限り、天然型のプロラクチン以外に、その変異体や部分ペプチドを用いることも可能である。

【0020】

また、本発明において、プロラクチン受容体の活性化により多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化が誘導されることが見出された。従って、本発明の方法においては、プロラクチン受容体を活性化する能力を有するプロラクチンの同効物を用いることが可能である。ここで「プロラクチンの同効物」とはプロラクチン同様にプロラクチン受容体を活性化し細胞内に信号を伝達する能力を有する化合物を指す。例えば、胎盤性ラクトゲン (placental lactogen) (Cohick et al., Mol. Cell. Endocrinol. 1996, 116, 49-58) が含まれる。

【0021】

本発明の方法において用いられる多能性間葉系幹細胞としては、好ましくは、NIH-3T3細胞であるが、BALB/c3T3、Swiss3T3なども使用可能と考えられる。本実施例において多能性間葉系幹細胞にプロラクチン受容体を高発現させ、プロラクチンを作用させると、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化効率が上昇を示した。従って、本発明の方法において用いられる多能性間葉系幹細胞は、プロラクチン受容体を高発現していることが好ましい。細胞におけるプロラクチン受容体の発現レベルは、例えば、プロラクチン受容体遺伝子を外来的に導入することにより引き上げることが可能である。具体的には、例えば実施例に示すように、プロラクチン受容体をコードするcDNAを含む発現ベクターを細胞に導入することができる。発現レベルは、用いるプロモーターや導入する遺伝子のコピー数などにより適宜調節することが可能である。

【0022】

プロラクチン受容体遺伝子は、当業者に公知の方法、例えば、その塩基配列情報に基づき作製したプライマーを用いて、プロラクチン受容体が発現している細胞や組織（例えば肝臓など）由来のcDNAライブラリーのスクリーニングなどの方法で単離することが可能である。

【0023】

該遺伝子を多能性間葉系幹細胞内で発現させるための発現ベクターとしては、

例えばpME18Sベクター (Mol. Cell. Biol. 8:466~472(1988))、CMV promoterをもつ発現ベクターなど、動物細胞で発現可能なすべてのベクターを用いることができる。ベクターへのcDNAの挿入は常法により制限酵素サイトを用いたりリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11)。多能性間葉系幹細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology, edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能であるが、レトロウイルスを用いた方法も可能である (Pear et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8392-8396, 1993)。

【0024】

脂肪細胞への分化のための多能性間葉系幹細胞の培養は、例えば、実施例に記載の方法により行うことができる。

多能性間葉系幹細胞の増殖培地としては、一般的に、ウシ血清 (Calf serum) を添加したDMEM培地が用いられる。また、分化培地には、DEX、MIX、インスリン、およびウシ胎児血清 (FBS) などの脂肪細胞分化誘導ホルモンを添加したDMEM培地が用いられる。多能性間葉系幹細胞は血清要求性が非常に高いため、培養においては、二日に一度程度、培地を交換することが好ましい。

【0025】

本実施例において、培地に、プロラクチンに加えて、PPAR γ の活性化剤を添加すると脂肪細胞への分化の効率を有意に高めることができることが示された。従って、多能性間葉系幹細胞の培養培地は、好ましくはPPAR γ の活性化剤を含有する。培養においては、PPAR γ 活性化剤は、PPAR γ の発現のピークとなる時期に添加すると好ましい (例えば、本実施例における脂肪細胞分化誘導刺激から48時間経過後)。PPAR γ の活性化剤としては、例えば、トログリタゾン、エングリタゾン、ピオグリタゾンなどのチアゾリジンジオン (Thiazolidinedione) やETYA、BRL49653、15 deoxy- Δ 12,14-prostaglandine J2などが挙げられる。

【0026】

また、本発明において、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化にプロラクチン-プロラクチン受容体を介したシグナル伝達に関与していることが見出された。このプロラクチン-プロラクチン受容体を介したシグナル伝達を阻害または促進することにより、脂肪細胞の分化を阻害または促進することができると考えられる。従って、本発明は、また、プロラクチン-プロラクチン受容体を介したシグナル伝達を阻害または促進する化合物を有効成分とする、脂肪細胞の分化の阻害剤および促進剤に関する。本発明の脂肪細胞の分化の阻害剤または促進剤には、例えば、プロラクチン、プロラクチン活性化剤、またはプロラクチン受容体活性化剤を有効成分とする脂肪細胞分化促進剤、並びにプロラクチンシグナル伝達阻害剤またはプロラクチン受容体阻害剤を有効成分とする、脂肪細胞分化阻害剤を含有する。

【0027】

このような阻害剤や促進剤は、例えば、上記の多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる系を利用してスクリーニングすることができる。即ち、上記の多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる系に被検試料を添加し、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化効率を検出することによりスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、具体的には、(a)被検試料、およびプロラクチンまたはその同効物の共存下、多能性間葉系幹細胞を培養する工程、(b)該細胞の脂肪細胞への分化を検出する工程、および(c)被検試料非共存下(対照)における場合と比べ、該変化を阻害または増強する化合物を選択する工程、を含む。

【0028】

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、精製タンパク質(抗体を含む)、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清、合成低分子化合物のライブラリー、リボザイム、アンチセンス核酸などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0029】

例えば、被検試料として抗体を用いる場合、その形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部

も含まれる。抗体の作製は、常法に従って行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.12~11.13; Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4~11.11; 「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M.J et al. (1997) Nat. Genet. 15:146-156」; Methods in Enzymology 203, 99-121(1991))。

【0030】

被検試料としてタンパク質やRNAを用いる場合、直接細胞へ作用させるのではなく、これらをコードするcDNAを、後述のプロラクチン受容体cDNAの場合と同様の方法を用いて発現ベクターに組み込み、細胞へ導入することによって、細胞内でこれらの被検試料を生産させることも可能である。

【0031】

このスクリーニングは、具体的には、例えば、被検試料の存在下、実施例1から3に記載されたように、プロラクチンを含む培地で多能性間葉系幹細胞をインキュベートし、該細胞の脂肪細胞への分化を検出することにより実施することができる。多能性間葉系幹細胞としては、実施例4に記載のように、プロラクチン受容体を高発現する多能性間葉系幹細胞を用いることができる。また、この細胞に被検試料を作用させる（被検試料となるcDNAを導入することを含む）ことによってその被検試料がプロラクチンもしくはプロラクチン受容体と共同で脂肪細胞への分化をより促進するか否かの機能評価が可能となる。また逆にプロラクチンもしくはプロラクチン受容体による多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を阻害するか否かも同様の実験によって検証可能となる。

【0032】

本発明のスクリーニング方法における多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化の検証は、例えば、細胞質における脂肪の蓄積すなわち脂肪滴の形成、細胞の形態変化（未分化では繊維状の形態であるが分化が進んでくると丸みを帯びてくる）などの脂肪細胞としての表現型を検出することにより行うことができる。検出は、顕微鏡を用いた観察により行うことができる。さらに観察された滴が脂肪を

含有しているか否か細胞をフォルムアルデヒドなどで固定後Oil-Red-O試薬で染色して調べる。脂肪酸、中性脂肪、コレステロールエステルなどは濃赤色に染まるがリン脂質やセレブレシドは淡赤色に染まる。また、分子生物学的に脂肪細胞のマーカー遺伝子や脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子の発現を指標として検証することも可能である。脂肪細胞のマーカー遺伝子としては、例えば、aP2、GPD、Adipsin (Cook et al., 1987 Science 237, 402-5)、leptin (MacDougald et al., 1995 Proc Natl Acad Sci U S , 92, 9034-7) などが挙げられる。脂肪細胞への分化を誘導する遺伝子としては、例えば、PPAR γ 、C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP α 、ADD-1などが挙げられる。これら遺伝子の発現の検出は、転写レベルであればノーザンブロット法、RNase プロテクション法により解析することができる (Maniatis et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory)。また、翻訳レベルであれば、ウエスタンブロット、免疫沈降法により解析することができる。

【 0 0 3 3 】

このような多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化の検出の結果、被検試料の添加により有意な脂肪細胞への分化の阻害が検出されれば、該被検試料は脂肪細胞分化阻害剤の候補であると判定され、一方、脂肪細胞への分化の促進が検出されれば、該被検試料は脂肪細胞分化促進剤の候補であると判定される。本発明の促進剤としては、細胞を脂肪細胞へ完全に変換できなくても、該促進剤を添加しない場合に比べ、脂肪細胞への変換が有意に促進されればよい。また本発明の阻害剤としては、脂肪細胞への変換を完全には阻害できなくても、該阻害剤を添加しない場合に比べ、脂肪細胞への変換が有意に阻害されればよい。

【 0 0 3 4 】

このスクリーニングにより単離される化合物には、プロラクチンやプロラクチン受容体に直接作用するもの（例えば、プロラクチン受容体に作用しプロラクチンからのシグナル伝達を阻害するものやプロラクチン受容体に作用しプロラクチンと同様の効果を示すもの（プロラクチン受容体のアゴニストやアンタゴニスト）、プロラクチンに作用してそのプロラクチン受容体への結合を促進または阻害するものなど）の他、プロラクチン-プロラクチン受容体を介する脂肪細胞分化

の細胞内シグナル伝達経路において、プロラクチン受容体の下流で作用するものが含まれる。

【 0 0 3 5 】

また、本発明の脂肪細胞の分化促進剤または分化阻害剤のスクリーニングは、プロラクチンおよび／またはプロラクチン受容体を直接標的として行うこともできる。このスクリーニング方法の一つの態様は、プロラクチンを標的とするものであり、(a) プロラクチンと被検試料とを接触させる工程、および (b) プロラクチンに結合する化合物を選択する工程、を含む方法である。また、このスクリーニングの他の態様としては、プロラクチン受容体を標的とするものであり、(a) プロラクチン受容体と被検試料とを接触させる工程、および (b) プロラクチン受容体に結合する化合物を選択する工程、を含む方法である。

【 0 0 3 6 】

また、このスクリーニングの他の態様としては、プロラクチンおよびプロラクチン受容体を標的とするものであり、(a) 被検試料の存在下でプロラクチンとプロラクチン受容体とを接触させる工程、および (b) プロラクチンとプロラクチン受容体との結合を阻害または促進する化合物を選択する工程、を含む方法である。

【 0 0 3 7 】

用いるプロラクチン受容体は、精製タンパク質であっても、膜画分として存在していても、また、細胞表面に発現させたものであってもよい。例えば、プロラクチン受容体を強発現させた多能性間葉系幹細胞を被検試料およびプロラクチンの存在下で培養し、プロラクチンとプロラクチン受容体との結合の阻害または促進を、脂肪細胞への分化を指標に検出することによりスクリーニングを実施することができる。

【 0 0 3 8 】

また、本発明の脂肪細胞の分化促進剤または分化阻害剤のスクリーニングは、レポーターシステムを用いた方法で行うことも可能である。この方法は、(a) 内在性プロラクチン受容体を発現する細胞であって、プロラクチンに応答して活性化するプロモーターおよびその下流に機能的に結合されたレポーター遺伝子を

含むベクターが導入された細胞を提供する工程、(b) 該細胞に対し、被検試料または被検試料およびプロラクチンを接触させる工程、(c) 該細胞におけるレポーター活性を検出する工程、を含む。

【0039】

プロラクチンに応答して活性化するプロモーターとしては、これに制限されないが、例えば、カゼイン(casein)プロモーター (Wakao, H. et al., EMBO J, 1994, 13: 2182-2191) が挙げられる。また、レポーター遺伝子としては、これに制限されないが、ホタルルシフェラーゼ (firefly luciferase) 遺伝子 (Wakao, H. et al., EMBO J, 1994, 13: 2182-2191) が挙げられる。上記プロモーターの下流に結合したレポーター遺伝子を含むベクターの構築は、当業者に公知の遺伝子組換え技術により行うことができる。

【0040】

また、上記ベクターを導入する細胞としては、内在性のプロラクチン受容体を発現している細胞であれば特に制限はないが、例えば、CHO (Chinese hamster ovary) 細胞が挙げられる。

【0041】

このスクリーニングにおいて、レポーター活性の上昇または低下が検出されれば、用いた被検試料はそれぞれ脂肪細胞分化の促進剤または阻害剤の候補となる。

【0042】

本発明のスクリーニングにより得られた化合物は、プロラクチン-プロラクチン受容体を介するシグナル伝達を制御することにより脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物の候補となる。得られた化合物が実際に脂肪細胞の分化を制御するか否かは、上記した本発明の多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる系にこれら化合物を適用し、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を検出することにより判定することができる。

【0043】

本発明のスクリーニングにより得られた脂肪細胞の分化を阻害または促進する活性を有する化合物には、種々の医療上の応用が考えられる。例えば、分化促進

剤は、ノスカル (Thiazolidinedione) などのインシュリン抵抗性糖尿病改善薬との併用によるインシュリン抵抗性のさらなる改善が期待される。Thiazolidinedione 群薬剤によるインシュリン抵抗性解除の生体内での分子機構は未だ完全に解明されていないが、3T3L-1細胞においてTNF- α によるインスリン作用の阻害を解除するという報告がある (Szalkowski D et al. Endocrinology 136: 1474-1481, 1995)。また、Thiazolidinedione 群薬剤は脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化を促進し、インスリン抵抗性を惹起する肥大した脂肪細胞の数を減らし、インスリン感受性を亢進させる小型の良性脂肪細胞の数を増やすという説がある (Okuno A et al. J.Clin. Invest. 101(6):1354-61, 1998)。

【0044】

また、本実施例において、プロラクチンが、多能性間葉系幹細胞においてC/EBP β 遺伝子およびPPAR γ 遺伝子の発現を誘導することを見出された。従って、本発明は、また、プロラクチンを有効成分とする、PPAR γ の発現誘導剤およびC/EBP β の発現誘導剤を包含する。

【0045】

脂肪細胞の分化を制御し得る上記化合物を医薬品として用いる場合には、これらの化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせ製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。また、脂肪細胞の分化を制御し得る上記化合物は、様々な実験において脂肪細胞の分化を制御するための試薬として用いることも可能である。

【0046】

【実施例】

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例

に限定されるものではない。

【0047】

【参考例】 ノーザンブロット解析プローブ作製のためのcDNAの単離

C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 、PPAR γ 、aP2、およびGPD cDNAを、ノーザンブロット解析のプローブに用いるため、分化誘導9日目に構築した3T3-L1脂肪細胞cDNAライブラリーより、以下に示した各遺伝子に対応する合成オリゴヌクレオチドを用いて単離した。

【0048】

マウスC/EBP α , 5'-ATGGAGTCGGCCGACTTCTACGAGGCGGAG-3' (配列番号: 1)

マウスC/EBP β , 5'-ATGCACCGCCTGCTGGCCTGGGACGCAGCA-3' (配列番号: 2)

マウスC/EBP δ , 5'-ATGAGCGCCGCGCTTTTCAGCCTGGACAGC-3' (配列番号: 3)

マウスPPAR γ , 5'-ATGGTTGACACAGAGATGCCATTCTGGCCC-3' (配列番号: 4)

マウスaP2, 5'-ATGTGTGATGCCTTTGTGGGAACCTGGAAG-3' (配列番号: 5)

マウス GPD, 5'-ATGGCGTTTCAAAAGGCAGTGAAGGGGACT-3' (配列番号: 6)

【0049】

各遺伝子を単離するため、上記合成オリゴヌクレオチドをDIG標識して3T3-L1脂肪細胞cDNAライブラリーをスクリーニングすることによりポジティブクローンを得た。in vivoの切り出しによりlamda gt 22 phageに組み込まれた各クローンをプラスミドpZL1のインサートとして取得した(Gibco BRL)。

【0050】

【実施例1】 多能性間葉系幹細胞 (NIH-3T3細胞) および3T3-L1脂肪前駆細胞のC/EBP β mRNAの発現に及ぼすプロラクチンの影響

C/EBP β mRNAの発現は、MIX、Dex、インスリン、LPS、インターロイキン-1 (IL-1)、IL-6、および成長ホルモンなどのさまざまな刺激により誘導されることが知られている (S. Akira et al. (1990) EMBO J. 9: 1897-1906; Z. Cao et al. (1991) Genes Dev. 5: 1538-1552; R.W. Clarkson et al. (1995) Mol. Endocrinol. 9: 108-120)。本発明者らは、プロラクチンが、3T3-L1脂肪前駆細胞 (国立衛生研究所細胞バンク, JCRB9014) や多能性間葉系幹細胞 (NIH-3T3細胞) (理研細胞バンク、カタログ番号RCB0150) のC/EBP β mRNAの発現を誘導する

かを検討した。

【0051】

10%ウシ血清 (CS) (GIBCO BRL社製) を含むDMEM (日本生物研究所製) で培養しコンフルエントに達した細胞を、10%ウシ胎児血清 (FBS)、あるいは下記に示すさまざまなエフェクター存在下もしくは非存在下でプロラクチン (Sigma社) の量を変化 (37ng/ml、111ng/ml、333ng/ml、および1 μ g/ml) させて3時間作用させた。その後、全RNAを文献「P. Chomczynski and N. Sacchi, 1987, *Anal. Biochem.* 162: 156-159」の方法に従って単離し、1%アガロース/2.2Mホルムアルデヒドゲル電気泳動後、ナイロンメンブランへ移した (T. Maniatis et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。メチレンブルーでrRNAを染色 (D.L. Herrin and G.W. Schmidt (1988) *Biotechniques* 6: 196-197, 199-200) し、RNAのトランスファー効率および量が均一であることを確認した。

【0052】

Boehringer Mannheim社のプロトコールに従い、C/EBP β cDNAを含むpZL1をEcoRIにより直鎖化し、*in vitro*転写によりDIGラベルされたRNAプローブを作製した。作製されたアンチセンスRNAプローブを用いて、添付のプロトコール (Boehringer Mannheim社) に従いノーザンハイブリダイゼーションを行った。

【0053】

その結果を図1 AおよびBに示す。3T3-L1細胞においては、プロラクチン依存的なC/EBP β mRNAの発現は観察されなかった (図1 A、レーン1~5) が、MIX (0.5 mM) (レーン6)、Dex (1 μ M) (レーン7)、およびインスリン (10 μ g/ml) (レーン8) に関しては、既に報告されているように、単独で3T3-L1細胞におけるC/EBP β mRNAの発現を増強した。FBSはC/EBP β mRNAの発現を中程度に増強したが、MIX、DEX、またはインスリンに比べると効率は低かった (レーン9)。また、プロラクチン依存的なC/EBP δ の発現は観察されなかった。

【0054】

上記の誘導剤を添加せず、10%CS(ウシ血清)存在下で培養したNIH-3T3細胞は

、3時間の培養後、中程度のC/EBP β の発現が観察された(図1B、レーン1)。プロラクチンを、用量を変化させて作用させると、濃度依存的なC/EBP β 転写産物の増加が認められた。プロラクチン濃度が333ng/mlになると、C/EBP β の転写量は飽和に達した(図1B、レーン4)。MIXはC/EBP β mRNAのレベルをプロラクチンと同程度に増加させた(レーン6)。DEXやインスリンも、C/EBP β の転写を増強した(レーン7および8)。FBSは、プロラクチンほどにはC/EBP β mRNAの産生を誘導しなかった(レーン9)。これらの結果から、プロラクチンは、少なくとも多能性間葉系幹細胞において、C/EBP β の転写を誘導することが判明した。

【0055】

[実施例2] プロラクチンはNIH-3T3細胞および脂肪前駆細胞3T3-L1細胞において、PPAR γ の転写を誘導する

異所的にC/EBP β が発現する多能性間葉系幹細胞では、C/EBP β のレベルが一定の閾値を超えるとPPAR γ の発現が活性化されることが知られている(Z. Wu et al. (1995) Genes Dev. 9: 2350-2363)。そこで、プロラクチンの投与がPPAR γ の発現を誘導するかを調べた。

【0056】

10%ウシ血清、インスリン(10 μ g/ml)、DEX(1 μ M)、およびMIX(0.5 mM)を含むDMEM中に量を変化させながらプロラクチンを加え、コンフルエントになった細胞へ48時間作用させた。対照として、10%FBS、インスリン、DEX、およびMIXを含むDMEMを、コンフルエントになった細胞へ同じ時間作用させた。PPAR γ mRNAの発現はMIX、DEX、およびインスリンの存在に依存する(Z. Wu et al. (1996) Mol Cell Biol. 16: 4128-4136)ため、これら3つの脂肪細胞分化誘導ホルモン(adipogenic hormones)の存在下で実験を行った。FBSにはプロラクチンが含まれる(R. Biswas and B.K. Vinderhaar (1987) Cancer Res. 47: 3509-3514)ため、そのプロラクチンの影響を除外するための対照として、10%CS含有培地に上記3つの脂肪細胞分化誘導ホルモンを加えたものを使った実験も行った。

【0057】

3T3-L1細胞およびNIH-3T3細胞から全RNAを単離し、PPAR γ cRNA(アンチセンスRNA)をプローブとして前述のC/EBP β の場合と同様にノーザンブロット解析を行

った。図2にその結果を示す。その結果、PPAR γ mRNAはプロラクチンの濃度依存的に誘導されていることが判明した。2日間培地にプロラクチンが存在しなかったにも関わらず、3T3-L1細胞において低レベルのPPAR γ mRNAが観察された（図2 A、レーン1）。培地へプロラクチンを添加すると、PPAR γ mRNA量はさらに増強された（レーン2～5）。10%FBSを含む培地は、333ng/mlのプロラクチンを含む培地と同程度、PPAR γ mRNAを誘導した（レーン4と6を比較のこと）。NIH-3T3細胞においても同様に、プロラクチンの用量依存的なPPAR γ mRNAの誘導が起こった（図2 B、レーン1～5）。しかしながら、プロラクチン非存在下では、PPAR γ mRNAは検出されなかった（レーン1）。3T3-L1細胞と同様に、10%FBSは333ng/mlのプロラクチンと同様のPPAR γ mRNAの誘導能を示した（レーン4と6を比較のこと）。すなわち、これらの細胞株において、プロラクチンはPPAR γ mRNAを誘導することが判明した。

【0058】

〔実施例3〕 分化培地へのプロラクチンの添加はNIH-3T3細胞の脂肪細胞分化プログラム (adipogenic program) を始動させる

上記実施例の結果から、プロラクチンを分化培地へ添加することにより、多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させることができる可能性が考えられた。そこで、NIH-3T3細胞を用いて、全分化過程において通常の許容条件 (permissive conditions) で、プロラクチン存在下、分化試験を行った。

【0059】

すなわち、コンフルエントに達した細胞を、10%FBS、1 μ M DEX、0.5mM MIX、および10 μ g/mlインスリンを含むDMEMに培地を交換した（0日目）。48時間後、培地を10%FBS、2.5 μ g/mlインスリンを含むDMEMに交換し、以後1日おきに培地を交換した。これを通常の許容培地とした。また、2種類の培地にそれぞれ1 μ g/mlのプロラクチンを加え、同様に培養した。

【0060】

脂肪細胞の分化マーカー遺伝子であるaP2およびグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD) cRNAをプローブとして用いて、上記と同様の方法でノーザンブロット解析を行った。

【0061】

その結果、これらの培地で12日間インキュベーションを行っても、ノーザン解析では aP2、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GPD) 等の分化マーカー遺伝子の発現は検出されなかった。さらに、細胞の形態変化や細胞内の脂肪滴形成も観察されなかった。これらの結果から、通常の許容培地にプロラクチンを加えるだけでは最終的な脂肪細胞分化遺伝子の発現を活性化させるには十分とはいえないことが示唆された。

【0062】

3T3-L1脂肪前駆細胞と異なり、通常の許容培地では、NIH-3T3細胞は脂肪細胞へ変換しないことから、これらの細胞を脂肪細胞へと分化させる強い許容培地の使用を試みた。

チアゾリジンジオン (thiazolidinediones) として知られる化合物はPPAR γ の強力な活性化因子であり、脂肪細胞への分化を強く促進する (B.M. Forman et al. (1995) Cell 83: 803-812; J.M. Lehmann et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 12953-12956)。トログリタゾン (troglitazone) はこれらの化合物の一員であり、多能性間葉系幹細胞を脂肪細胞へ分化させる能力を上昇させる (J.M. Lehmann et al. (1995) J. Biol. Chem. 270: 12953-12956)。この化合物を用いてさらに実験を行った。

【0063】

まず、10%FBS、1 μ M DEX、0.5 mM MIX、および10 μ g/mlインスリンを含むDME Mで細胞を48時間インキュベートし、その後インスリン (2.5 μ g/ml)、10%FBSと共に5 μ Mのトログリタゾンを含むDMEM (強い許容培地) と交換した。培地は一日おきに交換した。また、トログリタゾン添加前後の培地に1 μ g/mlのプロラクチンを加え、同様に培養した。

【0064】

図3は、上記のようにして行ったノーザンブロット解析による、分化誘導過程におけるさまざまなmRNA発現の時間経過を示している。C/EBP β mRNAのレベルは24時間以内に最大に達し、48時間までそれが維持された (図3、レーン2~3)。3日後、発現レベルは徐々に低下した (図3、レーン4~7)。これらの性質は3T3

-L1細胞で観察されたもの (Z. Cao et al. (1991) Genes Dev. 5: 1538-1552) と一致していた。2日目までは、C/EBP β mRNAレベルのプロラクチン依存的な変化は観察されなかった (レーン2~3および8~9を比較のこと)。しかし3日目以降は、プロラクチンが存在すると、C/EBP β mRNAはいくらか高いレベルに維持されることが判明した (レーン4~7および10~13を比較のこと)。

【0065】

また、C/EBP δ cRNAをプローブとして上記と同様にノーザンブロット解析を行った結果、C/EBP δ mRNAのレベルも脂肪細胞への分化誘導と共に高まり、2日間高いレベルに維持された (図3、レーン2~3)。しかし3日目には、C/EBP δ mRNA量は急速に低下し、その後はほとんど検出されなかった。これは、3T3-L1細胞で観察された結果と対照的である。3T3-L1細胞では、C/EBP δ mRNAは4日間高いレベルに維持され、その後次第に低下して行く (Z. Cao et al. (1991) Genes Dev. 5: 1538-1552)。プロラクチンの有無によるC/EBP δ mRNAレベルの明白な違いは検出されなかった (図3、レーン2~3および8~13を比較のこと)。

【0066】

3T3-L1細胞においては、PPAR γ mRNAレベルは細胞の分化により上昇することが知られている (Tontonoz, 1994 Cell 79 1147-1156)。NIH-3T3細胞で、同様のことが起こるかどうかを調べた。PPAR γ mRNA量は、MIX、DEX、およびインスリンによるインキュベーション2日目以降上昇し、プロラクチン非存在下ではその後急速に減少した (レーン1~7)。それに対して、プロラクチンを培地に加えた場合、転写産物のレベルは3T3-L1細胞と比べるとかなり低い、2日目のPPAR γ mRNAの発現は劇的に増加し、10日目まで維持された (レーン3、9、8~13)。

【0067】

プロラクチンによりC/EBP β が誘導されたことから、C/EBPファミリーに属するもう一つの転写因子であるC/EBP α mRNAのプロラクチンの影響を調べた。C/EBP α cRNA (アンチセンスRNA) をプローブに用いて、上記と同様にノーザンブロット解析を行った結果、前記と同様の条件において、C/EBP α mRNAは検出されなかった。このことは、C/EBP β mRNAを異所的に発現する多能性間葉系幹細胞における観察と一致する (Z. Wu et al. (1995) Genes Dev. 9: 2350-2363)。

【0068】

GPDおよびaP2遺伝子のノーザンブロット解析の結果、プロラクチンを含む培地にトログリタゾンを加えると、これら2つの遺伝子の発現を誘導することが判明した(図3)。プロラクチン非存在下でも、aP2 mRNAは3日目から10日目まで観察された(レーン4~7)。これらの強い許容培地にプロラクチンを加えることによって、aP2遺伝子の発現は増強された(図3、レーン4~7および10~13を比較のこと)。GPD遺伝子に対するプロラクチンの効果はより一層重大であった。プロラクチン非存在下では、GPD mRNAは検出されなかった。しかしプロラクチン存在下では、GPD mRNAは8日目に出現し、10日目までその量は増加した(図3、レーン12および13)。分化誘導8日後には一部の細胞がプロラクチンおよびトログリタゾン存在下において丸みを帯び、脂肪滴を蓄積しているのが観察されたがその量は少なかった。

【0069】

〔実施例4〕 プロラクチン受容体を異所的に発現するNIH-3T3細胞の脂肪細胞分化プログラムにおけるプロラクチンの効果

4-1)

プロラクチン受容体がNIH-3T3細胞を脂肪細胞へ変換する能力があるのかを調べた。ラットプロラクチン受容体遺伝子(PR) (Shirota M et al., 1990, Mol. Endocrinol., 4, 1136-1143; スイス、バーゼル フリードリッヒミーシャー研究所のDr. Roland Ballより供与) をpME18S (Mol. Cell. Biol. 8:466~472(1988)) へ組み込み、ネオマイシン耐性遺伝子をコードするpSV2neo (Clontech) と共に「lipofectAMINE PLUS (GIBCO BRL)」を用いて添付の説明書に従いNIH-3T3細胞へ安定にトランスフェクトした。具体的にはPRを含むプラスミド8 μ gとpSV2neo 0.4 μ gを20 μ lのPLUS試薬(GIBCO BRL)と30 μ lのlipofectAMINE (GIBCO BRL)と共に、1.5mlのOPTI-MEM I (GIBCO BRL)中で室温で30分間インキュベートした後、8mlのOPTI-MEM Iを加えた。1日前に10cmディッシュに8 $\times 10^5$ 細胞の密度でまいた細胞をOPTI-MEM Iで洗浄し、DNAを含む先の混合液を加えた。3時間37℃でインキュベートした後、10%正常ウシ血清を含むDMEMで24時間培養し、その後0.4mg/mlのG418で選択した。対照として、ネオマイシン耐性遺伝子(pSV2neo)

のみを導入した細胞も選択した。トランスフェクタントは14日間G418存在下で選択し、耐性クローンをコロニー形成させた。G418耐性コロニーを各々ほぼ同数（60～70/ディッシュ）含むディッシュを $1\mu\text{g/ml}$ のプロラクチンを含む前述の高許容条件に暴露させ、10日間in situで分化させた。具体的には、まず、10%FBS、 $1\mu\text{M}$ DEX、 0.5 mM MIX、 $10\mu\text{g/ml}$ インスリン、および $1\mu\text{g/ml}$ のプロラクチンを含むDMEMで細胞を48時間インキュベートし、ついでインスリン（ $2.5\mu\text{g/ml}$ ）、10%FBS、 $5\mu\text{M}$ のトログリタゾン、および $1\mu\text{g/ml}$ のプロラクチンを含むDMEM（強い許容培地）と交換し、8日間in situで分化させた。培地は一日おきに交換した。

【0070】

その後コロニーを、2%ホルムアルデヒドおよび0.2%グルタルアルデヒドを含むPBSで固定し、Oil-Red-Oで染色して脂肪細胞への変換（細胞質中の脂肪滴の蓄積）を観察した（A. Preece (1972) "Manual for histologic technicians", Boston, MA.: Little, Brown, and Co.）。ホルモンによる刺激の前には、脂肪滴を含有する分化した細胞は観察されなかった。しかし、前述の強い許容培地で10日間インキュベートすると、プロラクチン受容体をトランスフェクトしたプレート上に、いくつかの最終分化した脂肪細胞のコロニー（丸みをおびた細胞集団）が出現していることが、Oil-Red-O 染色により確認された（コロニー中50%以上の細胞が染色されている場合、分化したコロニーとした）。なお、形態変化を供なわない、すなわち繊維状の細胞集団はOil-Red-O では決して染色されなかった。

【0071】

同様の実験は3回繰り返した。これらの培地の条件においては、プロラクチン受容体遺伝子をコトランスフェクトしたG-418耐性コロニーの約11%が、最終分化した脂肪細胞となった。ネオマイシン耐性遺伝子のみをトランスフェクトした対照細胞では、分化したコロニーは約2%であった。これらの結果を表1にまとめた。表中、全コロニー数は、3回の独立したトランスフェクション実験で観察されたG418耐性コロニー数の合計である。また、分化コロニー数は、Oil-Red-O で50%以上が染色されたコロニー数である。このとき、脂肪細胞が散在するい

くつかのコロニーがあったが、Oil-Red-O染色により弱くしか染色されなかったため、分化コロニー数のスコアから除外した。

【0072】

【表1】

in situ コロニー分化アッセイ			
発現プラスミド	全コロニー数	分化コロニー数	比率(%)
pSV2neo	232	5	2.1
PR+pSV2neo	213	24	11.3

【0073】

これらのデータから、プロラクチン受容体は脂肪細胞への分化に重要な役割を果たしていることが確認された。

【0074】

4-2)

脂肪細胞分化の実験においては細胞クローン間の分化能の差異が非常に大きい
ため次に細胞を集団で扱いこれらの問題を排除した。

プロラクチン受容体を異所的に発現する安定したトランスフェクタントをG-418
選択により単離し、20,000以上のクローンを集めた。親細胞ではプロラクチン
によりC/EBP β およびPPAR γ mRNAが誘導されたことから、これらの遺伝子発現の
プロラクチン用量依存性を上記の細胞で調べた。

【0075】

コンフルエントに達した細胞を10%ウシ血清(CS)を含むDMEMにプロラクチン
を、用量を増やしながら加え、3時間培養した。全RNAを単離し、ノーザンブロッ
ト解析によりC/EBP β mRNAを解析した。

【0076】

ネオマイシン耐性遺伝子のみをトランスフェクトした対照細胞では、親細胞と

同様の、用量依存的なC/EBP β mRNAの発現が観察された（図1および図4A、レーン1～5）。プロラクチン受容体発現細胞群では、プロラクチンへの感受性がより高まった（図4A、レーン6～10）。

【0077】

次に、PPAR γ mRNAに及ぼすプロラクチンの影響も調べた。10%ウシ血清（CS）、10 μ g/mlインスリン、1 μ M DEX、および0.5 mM MIXを含むDMEMにプロラクチンを、用量を増やしながら細胞に加え、48時間培養した。図4Bはそのときの対照細胞およびプロラクチン受容体発現細胞からRNAを調製し、ノーザンブロット解析を行った結果である。対照細胞群では、親細胞と同様のプロラクチン量依存的なPPAR γ mRNAの発現が観察された（図2Bおよび図4B、レーン1～5）。これらにプロラクチン受容体を異所的に発現させた細胞群では、PPAR γ mRNA発現に対するプロラクチンの感受性が非常に高まった（レーン1～5および6～10を比較のこと）。

【0078】

図4Cに示したように、親細胞であるNIH-3T3および3T3-L1細胞では、プロラクチン受容体の発現はノーザンブロット法で検出レベルになかった（レーン1および2）。ネオマイシン耐性遺伝子のみを導入した対照細胞群でも、親細胞と同様、プロラクチン受容体はほとんど発現していなかった（レーン3）。それに対しプロラクチン受容体遺伝子を導入した細胞群ではトランスフェクトした遺伝子の高い発現が検出された（レーン4）。

【0079】

プロラクチン受容体の異所的な強発現がPPAR γ mRNAおよびC/EBP β mRNAの発現誘導を促進することから、プロラクチン受容体発現細胞群および対照細胞群でプロラクチンの存在下／非存在下における分化過程を解析した。具体的には、まず、10%FBS、1 μ M DEX、0.5 mM MIX、および10 μ g/mlインスリンを含むDMEMに培地を交換（0日目）し、48時間インキュベートした後、インスリン（2.5 μ g/ml）、10%FBSと共に5 μ Mのトログリタゾンを含むDMEM（強い許容培地）と交換した。培地は一日おきに交換した。また、トログリタゾン添加前後の培地に1 μ g/mlのプロラクチンを加え、同様に培養した。

【0080】

これらトランスフェクタントの全分化プログラムを下記の脂肪細胞特異的マーカー遺伝子のノーザンプロット解析により調べた（図5）。対照細胞においてはプロラクチン存在下において、3日後にC/EBP β mRNA発現は、親細胞の場合（図3）と同様に、わずかに上昇した（図5A）。プロラクチン受容体発現細胞群では、プロラクチン存在下において、特に3日目にC/EBP β mRNAの上昇が観察され（図5A、レーン4、9、および図5Bのそれらを比較のこと）、その後わずかに高い発現レベルが保たれた。C/EBP δ mRNAについては、全分化過程において、両細胞群ともプロラクチン添加の明確な効果は観察されなかった。対照細胞群では、プロラクチン非存在下で、PPAR γ mRNA発現は2日目にピークとなり、その後急速に低下した（レーン1～6）。プロラクチン受容体を異所的に強発現させるとPPAR γ の発現は増強された。プロラクチンにより、特にプロラクチン受容体発現細胞群では、分化プログラムの後期においてこの発現は比較的高く維持された（パネルAおよびB、レーン9～11）。aP2 mRNAは両細胞群において、3日目には検出された（レーン4）。プロラクチンの添加によりaP2 mRNA発現は強く活性化された（パネルAおよびB、レーン9～11を比較のこと）。プロラクチン受容体発現細胞群においては、プロラクチンの添加によりaP2 mRNAの発現はさらに強く活性化された。プロラクチン非存在下では、対照細胞群において8日後でもGPD mRNAはほとんど検出されなかった（パネルA、レーン6）が、プロラクチン存在下で8日目にその転写が上昇した（レーン11）。同様に、プロラクチン受容体発現細胞群においては、プロラクチン非存在下ではGPD mRNAは検出されなかった（パネルB、レーン1～6）が、プロラクチンの添加によりGPD mRNA誘導が増強され、5日目にはGPD mRNAが検出され、8日目には更に増加した（図5B、レーン10および11）。他の脂肪細胞分化関連マーカー遺伝子であるC/EBP α やアジプシン（adipsin）の発現は8日間の培養期間中検出されなかった。

【0081】

次ぎに細胞の分化を顕微鏡で観察した。「4-1）」と同様に脂肪細胞誘導培地で10日間培養後、プロラクチン受容体発現細胞群および対照細胞群をOil-Red-Oで染色したところ、ネオマイシン耐性遺伝子のみを導入した対照細胞では（プ

ロラクチン非存在下において)ほとんど脂肪細胞への変換が起きていなかった(1%以下、図6、Neo および表2)。これらの細胞にプロラクチンを添加すると丸みを帯びた細胞数が増えた。染色の結果、4%の細胞が分化したと判断した(図6、Neo+prolactin、表2)。一方、プロラクチン受容体を発現する細胞を同様の手順で分化誘導させると、プロラクチン存在下約18%の細胞が脂肪細胞への変換を起こし、脂肪滴を蓄積した(図6、Neo+PR+prolactin および表2)。またこの細胞群でもプロラクチン非存在下では分化率の低下がみられた(5%、図6、Neo+PR、表2)。このことはNIH-3T3細胞の脂肪細胞への効率的な分化のためにはプロラクチン受容体の高発現ばかりではなくその活性化が必要であることを示している。これらの安定なトランスフェクション実験を4回繰り返した結果、プロラクチン受容体遺伝子をコトランスフェクションしたG-418耐性細胞の13~23%が脂肪を蓄積した脂肪細胞へ変換した。結果を表2に示す。表中、分化した比率は、4回の独立した各トランスフェクション実験において、ランダムな10箇所の視野中の200細胞について計数した結果(平均±標準偏差)を表す。

【0082】

【表2】

プールしたクローンの分化アッセイ	
発現プラスミド	分化した比率(%)
pSV2neo	<1
pSV2neo+prolactin	4±1
PR+pSV2neo	5±2
PR+pSV2neo+prolactin	18±5

【0083】

以上の結果を総合すると、プロラクチン受容体は多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への変換に重要な役割を果たしていることが実証された。

【 0 0 8 4 】

【発明の効果】

本発明により、プロラクチンおよびPPAR γ によるシグナルが協調して、多能性間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を誘導していることが明らかとなった。この脂肪細胞の分化系を利用して、また脂肪細胞分化のシグナルの伝達に関連する因子を標的として、脂肪細胞への分化を促進または阻害する化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。スクリーニングにより得られる化合物は、インシュリン抵抗性糖尿病など、脂肪細胞分化が関与する疾患の予防や治療のための薬剤としての利用が期待される。

【 0 0 8 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

<120> Methods for inducing adipocyte differentiation,
and chemicals which control adipocyte
differentiation and methods for screening them.

<130> H1-007

<140>

<141>

<160> 6

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 1

atggagtcgg ccgacttcta cgaggcggag

30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 2

atgcaccgcc tgctggcctg ggacgcagca

30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 3

atgagcgccg cgcttttcag cctggacagc

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 4

atggttgaca cagagatgcc attctggccc

30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 5

atgtgtgatg cctttgtggg aacctggaag

30

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: an
artificially synthesized primer sequence

<400> 6

atggcgtttc aaaaggcagt gaaggggact

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

さまざまなエフェクターによる、3T3-L1細胞 (A) およびNIH-3T3細胞 (B) におけるC/EBP β mRNAの誘導を示す図である。

コンフルエントに達した細胞を、下記の異なるエフェクターを含む10%ウシ血清 (CS) 含有DMEM (レーン1~8)、または10%FBS (ウシ胎児血清) 含有DMEM (レーン9) で3時間培養した。細胞から全RNAを調製し、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによりC/EBP β の発現を調べた。各レーンには等量(8 μ g/レーン)のRNAを泳動し、リボソームRNAの染色によりそれを確認した。レーン1はエフェクターなし、レーン2~5はそれぞれ37ng/ml、111ng/ml、333ng/ml、および1 μ g/mlのプロラクチン、レーン6 (M) は0.5mM MIX、レーン7 (D) は1 μ M DEX、レーン8 (I) は10 μ g/mlインスリンを加えた結果を表す。

【図 2】

3T3-L1細胞 (A) およびNIH-3T3細胞 (B) における、プロラクチンの用量依存的なPPAR γ mRNAの誘導を示す図である。

コンフルエントに達した細胞を10%ウシ血清 (CS)、インスリン、DEX、およびMIXを含むDMEMに、プロラクチンを用量を増やしながら加え、48時間培養した(

レーン1～5)。対照として、コンフルエントに達した細胞を10%FBS、インスリン、DEX、およびMIXを含むDMEMで培養した(レーン6)。等量の全RNA(4 μ g/レーン)のノーザンブロット解析によりPPAR γ mRNAを調べた。レーン1はプロラクチンなし、レーン2～5はそれぞれ37ng/ml、111ng/ml、333ng/ml、および1 μ g/mlのプロラクチンを加えた場合の結果を示す。オートラジオグラムの露光時間は3T3-L1 RNAの場合は3分、NIH-3T3 RNAの場合は10分とした。

【図3】

NIH-3T3細胞の脂肪細胞分化プログラムにおけるプロラクチンの効果を示す図である。

コンフルエントに達した細胞を、10%FBS、インスリン、DEX、およびMIXを含むDMEMにおいて、1 μ g/mlのプロラクチン存在下(P)または非存在下(None)で48時間培養し、その後5 μ M トログリタゾン、2.5 μ g/mlインスリン、および10%FBSを含むDMEMにおいて、1 μ g/mlのプロラクチン存在下(P)または非存在下(None)で培養した。分化誘導後、図示した日数(days)に全RNAを単離し、各レーンに等量(3 μ g)のRNAを泳動しノーザンブロットハイブリダイゼーションにより図示した遺伝子の発現を解析した。

【図4】

NIH-3T3細胞にプロラクチン受容体を異所的に発現させた場合の、C/EBP β およびPPAR γ mRNA誘導の感受性の上昇を示す図である。

pSV2neoのみ(Neo)、またはプロラクチン受容体発現ベクターをpSV2neoと共に(PR)、NIH-3T3細胞へトランスフェクションした。

(A) : コンフルエントに達した細胞を10%ウシ血清(CS)を含むDMEMにプロラクチンを、用量を増やしながら加え、3時間培養した(レーン1～5、6～10)。全RNAを単離し、各レーンに等量(3 μ g)のRNAを泳動しノーザンブロットハイブリダイゼーションによりC/EBP β mRNAを解析した。レーン1および6はプロラクチンなし、レーン2および7は37ng/mlのプロラクチン、レーン3および8は111ng/mlのプロラクチン、レーン4および9は333ng/mlのプロラクチン、レーン5および10は1 μ g/mlのプロラクチンを加えた場合の結果を示す。

(B) : 10%ウシ血清(CS)、インスリン、DEX、およびMIXを含むDMEMにプロ

ラクチンを、用量を増やしながら細胞に加え、48時間培養した(レーン1~5、6~10)。等量の全RNA ($2\mu\text{g}$ /レーン) のノーザンブロット解析によりPPAR γ mRNAを調べた。プロラクチンの用量は(A)と同じとした。オートラジオグラムの露光時間は両RNAで同じにした。

(C) : プロラクチン受容体遺伝子のノーザンブロット解析の結果を表す図である。各レーンに $2\mu\text{g}$ の全RNAを泳動した。レーン1は3T3-L1細胞のRNA、レーン3はNIH-3T3細胞のRNA、レーン3はネオマイシン耐性遺伝子を安定に発現するNIH-3T3細胞群のRNA、レーン4はネオマイシン耐性遺伝子およびプロラクチン受容体遺伝子を安定に発現する細胞群のRNAのノーザンブロット解析の結果を表す。

【図5】

NIH-3T3細胞の脂肪細胞への分化プログラムにおけるプロラクチン受容体の影響を示す図である。

安定にプロラクチン受容体遺伝子が導入された細胞群をコンフルエントに達するまで培養し、プロラクチンなし (None) または $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロラクチン (P) を含むFBS分化培地で培養した。分化誘導後、図示した日数(days)に全RNAを単離し、各レーンに等量($3\mu\text{g}$)のRNAを泳動しノーザンブロットハイブリダイゼーションにより脂肪細胞特異的遺伝子の発現を解析した。(A) はネオマイシン耐性遺伝子を安定に発現する細胞群、(B) はネオマイシン耐性遺伝子およびプロラクチン受容体遺伝子を安定に発現する細胞群の結果を示す。

【図6】

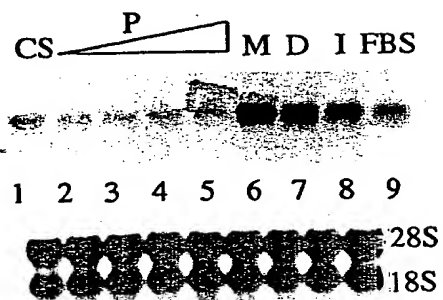
ネオマイシン耐性遺伝子のみ (Neo) またはプロラクチン受容体を共に (Neo+PR) 発現するNIH-3T3細胞群の顕微鏡写真である。

安定に遺伝子が導入された細胞をコンフルエントに達するまで培養し、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のプロラクチン非存在下もしくは存在下 (+prolactinと表記) で、それぞれ強い許容条件で10日間培養した。その後細胞を固定し、Oil-Red-Oで染色した。プロラクチン受容体を発現する細胞では、形態が丸くなり、Oil-Red-Oにより赤く染色された細胞が観察された。

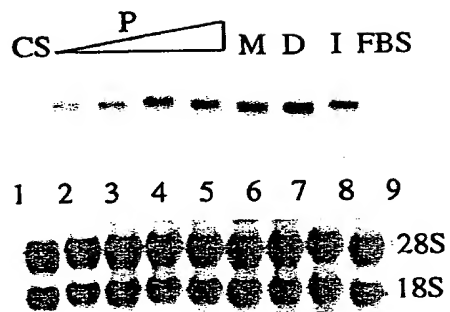
【書類名】 図面

【図 1】

A. 3T3-L1

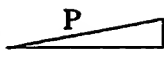


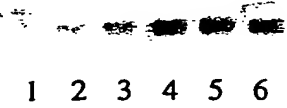
B. NIH 3T3



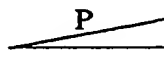
【図 2】

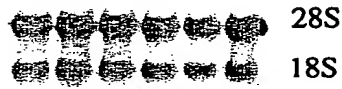
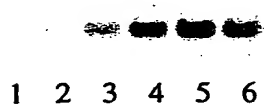
A. 3T3-L1

CS  FBS

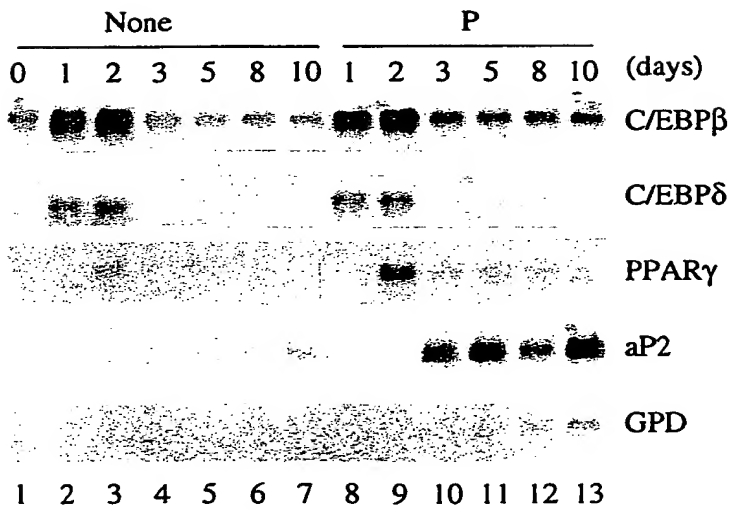


B. NIH 3T3

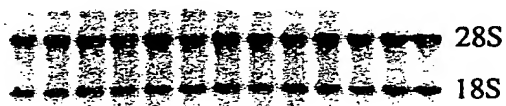
CS  FBS



【図 3】

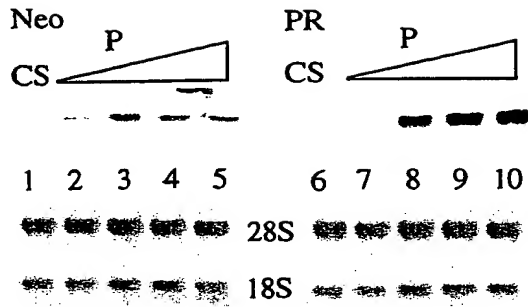


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

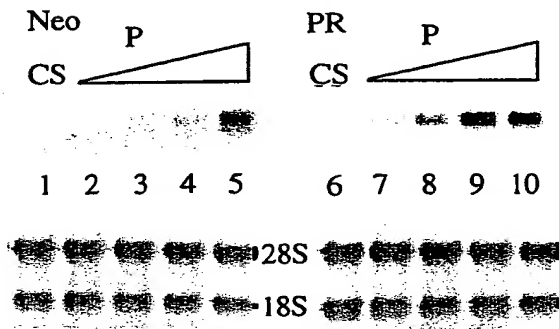


【図 4】

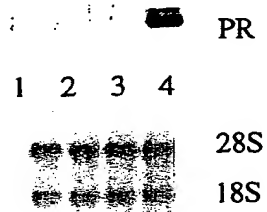
A.



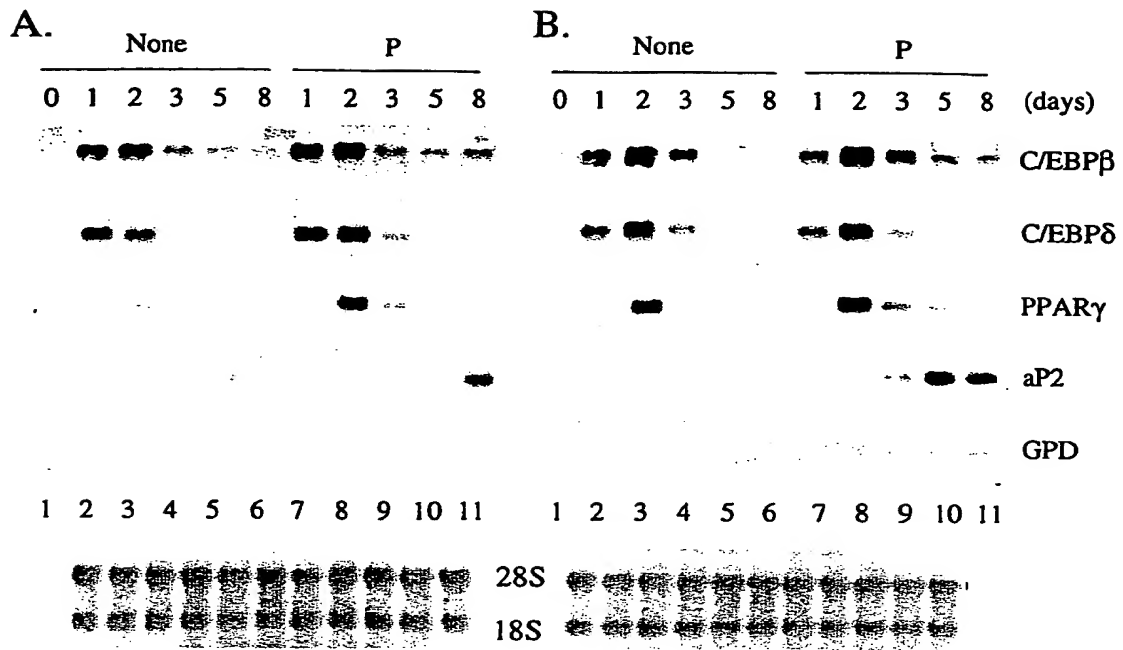
B.



C.



【図 5】



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[597059742]

1. 変更年月日

1997年 4月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県木更津市矢那1532番地3

氏 名

株式会社ヘリックス研究所